



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Desarrollo y validación de un modelo cuantitativo de análisis del riesgo de *Salmonella* en zumo de naranja

Development and validation of a quantitative model based on risk assessment of Salmonella in orange juice

Autor:

Víctor Buñuel Sorribas

Directores:

Guillermo Cebrián Auré

Silvia Guillén Morer

Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza

2020/2021

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Características generales del género <i>Salmonella</i>	2
1.2. Relevancia de <i>Salmonella</i> en el contexto alimentario	2
1.3. <i>Salmonella</i> y su relevancia en zumo de naranja.....	3
1.4. El análisis de riesgo como herramienta para cuantificar el riesgo de <i>Salmonella</i> en alimentos.	4
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. Microorganismos.....	6
3.2. Medios de cultivo, recuperación y tratamiento	6
3.3. Obtención de suspensiones microbianas.....	7
3.4. Obtención de cultivos celulares.....	7
3.5. Tratamientos.....	8
3.5.1. Tratamiento térmico.....	8
3.5.2. Tratamiento con fluido gástrico e intestinal	8
3.5.3. Adhesión e invasión a células intestinales.....	9
3.6. Recuperación y recuentos microbianos	9
3.7. Análisis de los datos	9
3.8. Análisis de riesgo	10
4. RESULTADOS	10
4.1. Caracterización de la capacidad de resistencia e invasión de las cepas de <i>Salmonella</i>	11
4.1.1. Supervivencia de las células de <i>Salmonella</i> en zumo de naranja a 4 °C.	11
4.1.2. Resistencia a tratamiento térmico	11
4.1.3. Resistencia al SGF y SIF.....	12
4.1.4. Caracterización de la capacidad de invasión celular	13
4.2. Estudio de las posibles interacciones entre agentes o tratamientos	13
4.2.1. Efecto de la incubación en zumo en la resistencia a tratamiento térmico.	14
4.2.2. Efecto del tratamiento térmico en la supervivencia en zumo de naranja.	14
4.2.3. Efecto del tratamiento térmico e incubación en zumo de naranja en la supervivencia a SGF.....	15
4.2.4. Efecto del tránsito gastrointestinal en la invasión celular.	16
4.3. Estudio de la influencia de la concentración celular en la resistencia a agentes o tratamientos.	17

4.3.1.	Estudio de la influencia de la concentración celular en la resistencia a tratamiento térmico.....	17
4.3.2.	Estudio de la influencia de la concentración celular en la supervivencia a la incubación en zumo a 4 °C tras el tratamiento térmico.	18
4.3.3.	Estudio de la influencia de la concentración celular en la supervivencia al tratamiento con SGF.....	18
4.4.	Análisis de riesgo <i>in silico</i>	18
4.5.	Validación <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de la cadena real.....	20
5.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	22
6.	REFERENCIAS.....	23

I. RESUMEN

Los microorganismos del género *Salmonella* son responsables de la salmonelosis, la segunda infección alimentaria más frecuente en humanos en la Unión Europea. Aunque la mayor parte de los casos de salmonelosis se dan en huevos o productos cárnicos, últimamente ha aumentado el número de brotes por consumo de productos agrícolas frescos contaminados, entre los que se encuentra el zumo de naranja. Tanto es así que en este último tipo de productos *Salmonella* se considera el patógeno de referencia en numerosos países.

Para controlar las infecciones alimentarias causadas por *Salmonella*, las autoridades han establecido diferentes criterios. Sin embargo, todos ellos se basan en aproximaciones determinísticas que, idealmente, deberían ser reemplazadas por otras probabilísticas, basadas en análisis cuantitativos del riesgo, que proporcionan una visión más integrada de la cadena y una estimación real del problema y como reducir su incidencia. Por ello, el presente Trabajo Fin de Grado tiene por objetivo diseñar y validar (tanto *in-silico* como *in-vitro*) un modelo en módulos que simule la cadena de fabricación, almacenamiento y consumo de zumo de naranja y que permita realizar un análisis del riesgo relativo asociado al consumo de zumo de naranja que supondrían distintas cepas de *Salmonella*.

De los resultados obtenidos concluidos cabe concluir que, de entre las cepas estudiadas, *S. Enteritidis* 7236 sería la que supondría un mayor riesgo en todos los escenarios simulados. Esta cepa no es la más resistente a ninguno de los agentes estudiados, lo que cuestionaría la utilidad de los criterios de control clásicos basados en la aplicación de tratamientos de inactivación diseñados para alcanzar un determinado nivel de reducción de la cepa más resistente. Así mismo, también se demostró que el modelo probabilístico desarrollado es capaz de predecir razonablemente los resultados que se obtendrían *in-vitro*, siendo además capaz de proporcionar datos extremadamente relevantes acerca de la probabilidad de que sucedan los diferentes escenarios.

ABSTRACT

The microorganisms of *Salmonella* genus are responsible for salmonellosis, the second most frequent foodborne infection in humans in the European Union. Even though most cases of salmonellosis occur in eggs or meat products, recently it has been observed an increment in the number of outbreaks related to the consumption of contaminated fresh farm products, among which orange juice is present. Consequently, in many countries *Salmonella* is considered the reference pathogen for this type of products.

In order to control foodborne infections caused by *Salmonella*, the authorities have established different criteria. However, all of them are deterministic approaches that, ideally, should be replaced by probabilistic ones, based on quantitative risk assessments, which provide a more integrated view of the chain and a realistic estimation of the problem and how to reduce its incidence. Therefore, the aim of this Final *Degree Project* is to design and validate (both *in-silico* and *in-vitro*) a module based model simulating the manufacturing, storage and consumption chain of orange juice, that allows an analysis of the relative risk associated with the consumption of orange juice by different strains of *Salmonella*.

Regarding to the results obtained, it can be concluded that, between the strains studied, *S. Enteritidis* 7236 would be the strain with the highest associated risk in every situation studied. This strain is not the most resistant to any of the agents studied, which would question the usefulness of classical control criteria based on the application of inactivation treatments designed to reach a certain level of reduction of the most resistant strain. Furthermore, it was proved that the probabilistic model developed is able to reasonably predict the results obtained in *in-vitro* analysis, and also that it is able to provide extremely important data about the probability of different situations happening.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, orden *Enterobacteriales*, clase *Gammaproteobacteria*, filo *Proteobacteria* y dominio *Bacteria* (NCBI, 2021). Entre sus principales características, destacan por ser bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, oxidasa negativos, catalasa positivos, reductores de nitrato a nitrito y fermentadores de carbohidratos como la D-glucosa (Jajere, 2019; Le Minor y Popoff, 1987). Su hábitat es principalmente el tracto digestivo de humanos y animales. Por lo tanto, la presencia en otros ambientes, como agua o alimentos, se debe a contaminación fecal (Grimont et al., 2000). Son bacterias con una capacidad de adaptación elevada, algunas de ellas son específicas de un hospedador. Sin embargo, otras poseen un rango de hospedadores más amplio, siendo estas las que representan un riesgo desde el punto de vista de la microbiología de los alimentos (Uzzau et al., 2000).

Desde el descubrimiento del género, se ha producido mucha polémica en torno a la clasificación por especies, usando el tipo de cuadro clínico que producían, las serovariedades o las propiedades bioquímicas como parámetros de clasificación (Le Minor y Popoff, 1987). A día de hoy se aceptan dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Anteriormente subespecie V). *S. enterica* se clasifica a su vez en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (II), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (III), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (P. A. Grimont et al., 2000). Las cepas pertenecientes a *S. enterica* subsp. *enterica* están asociadas con patologías en vertebrados de sangre caliente, y suelen ser transmitidos mediante ingesta de alimentos o de agua contaminada (Uzzau et al., 2000). A su vez, el género se divide en más de 2600 serovariedades, clasificadas en función de sus tres antígenos principales: somático (O), flagelar (H) y capsular (K) (Sanderson et al., 2013). Históricamente, se han asignado nombres distintos a serovariedades con una misma fórmula antigénica, pero que difieren en su bioquímica, patogenicidad o hábitat (Grimont y Weill, 2007). El antígeno O forma parte del lipopolisacárido, y está constituido por repeticiones de tetra- o pentasacáridos con inclusiones de deoxi- y dideoxihexosas. El número de repeticiones varía entre cepas (Rycroft et al., 2013). El antígeno H está formado por el flagelo, una compleja estructura formada principalmente por miles de subunidades monoméricas de flagelina y que permite a la bacteria moverse. Destaca su sistema de expresión difásico mediante dos loci distintos, único en *Salmonella*. Cada loci codifica para la formación de un flagelo con proteínas y antígenos distintos, pero solo uno de ellos puede ser expresado a la vez (McQuiston et al., 2008). El antígeno Vi es un polisacárido capsular, presente solo en cepas de *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *S. Dublin*. Los genes codificantes se encuentran ubicados en la isla de patogenicidad 7 de *Salmonella* (Rycroft et al., 2013).

1.2. Relevancia de *Salmonella* en el contexto alimentario

La salmonelosis es la segunda causa de infecciones gastrointestinales en humanos en la Unión Europea, tras la campilobacteriosis. *Salmonella* provocó en el año 2019 el 17,9% de los brotes originados por transmisión alimentaria. Los alimentos que con mayor frecuencia se identifican como responsables de los brotes de origen alimentario por *Salmonella* son huevos y derivados (37,0%). Seguidamente, se encuentran los productos de panadería y pastelería (11,7%), ya que muchos de ellos contienen huevo. Por último, las infecciones por consumo de carne de pollo, cerdo y pavo (9,8%) también son frecuentes al no realizar un correcto cocinado. Aunque en menor proporción, también se pueden dar intoxicaciones por consumo de zumos, leches o alimentos de composición mixta (8,7%) (EFSA y ECDC, 2021).

Las infecciones por *Salmonella* causan, principalmente, dos cuadros clínicos en humanos: fiebres tifoideas y paratifoideas y gastroenteritis. Las fiebres tifoideas y paratifoideas están causadas por las serovariedades *S. enterica* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B y Paratyphi C. Estas serovariedades tienen al humano como único huésped, y su transmisión se da principalmente en países en vías de desarrollo con escasos recursos sanitarios e higiénicos (Crump et al., 2015). En la infección, la bacteria pasa a sangre mediante el sistema linfático del intestino, y después se traslada hasta el hígado, el bazo o la médula ósea (Liu, 2017). Algunos de sus síntomas son fiebre, dolor de cabeza, tos seca o

bradicardia. Entre el 10-15% de los casos causan complicaciones que acaban derivando en cuadros clínicos más severos. Las *Salmonellas* no-tifoideas (NTS) producen infecciones relacionadas con intoxicaciones alimentarias. *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son los principales patógenos, causando fiebre enterica y gastroenteritis al localizarse en el colon, íleon y nodos linfáticos mesentéricos (Liu, 2017). No obstante, serovariedades como *S. Heidelberg*, *Dublin* y *Choleraesuis* pueden ser invasivas, produciendo cuadros clínicos muy graves y bacteriemia (Crump et al., 2015).

Los parámetros (rangos) de crecimiento y supervivencia de *Salmonella* son extremadamente importantes desde el punto de vista alimentario. *Salmonella* es un género mesófilo, con crecimiento desde 7 °C hasta 49,5 °C y con una temperatura óptima entre 35°C y 37°C. Puede sobrevivir largos periodos de refrigeración (Lake et al., 2002). En cuanto al pH del medio, es capaz de crecer desde pH 3,8 hasta 9,5 con un pH óptimo de 7,0-7,5 (ELIKA, 2013). En relación a la actividad de agua, *Salmonella* no es capaz de crecer en alimentos cuando la actividad de agua es menor de 0,94, siendo la actividad de agua óptima 0,99. Sobrevive en alimentos con baja actividad de agua (Ej. Chocolate $a_w=0,3-0,5$) durante meses, y la exposición a ambientes secos aumenta la resistencia al calor de la bacteria (Lake et al., 2002). *Salmonella* no tolera concentraciones mayores del 9% de cloruro de sodio (Jay et al., 2005).

1.3. *Salmonella* y su relevancia en zumo de naranja.

A pesar de que la mayoría de los casos de salmonelosis se dan en huevos y ovoproduitos, o productos cárnicos y derivados, durante las últimas décadas se ha producido un aumento de brotes por consumo de productos agrícolas frescos contaminados. La presencia de *Salmonella* en vegetales se debe a contaminación ambiental, contaminación del agua de riego o por la manipulación humana en el proceso de cosecha, transporte o procesado (Hanning et al., 2009). El estudio realizado por Nutt et al. (2003), demuestra que *S. Typhimurium* aislada de pollo es capaz de sobrevivir y crecer en productos frescos como brócoli, pimiento verde, lechuga o tomate. Las contaminaciones no solo se dan en productos frescos, sino también en hierbas y especias como camomila, orégano, laurel o pimienta, entre otros (Rabsch, W., Simon, S., & Humphrey, 2013).

Uno de los potenciales focos de contagio son los zumos frescos de fruta. La presencia de *Salmonella* spp., Typhi y Typhimurium ha sido estudiada en zumos de naranja, manzana, melón, carambola y zanahoria. Los resultados mostraron presencia de *Salmonella* spp. en el 34% de las muestras y de *Salmonella* Typhimurium en el 10%. En concreto, en el zumo de naranja, *Salmonella* spp. estaba presente en el 20% de los casos y *S. Typhimurium* en el 10% (Diana et al., 2012). El crecimiento y/o supervivencia de *Salmonella* en estos zumos está determinado, principalmente, por el pH de los mismos. A su vez, el pH está determinado por las contribuciones de distintos ácidos. Así pues, una mayor concentración de ácidos conducirá a un pH más bajo en el zumo y, por tanto, un mayor efecto inhibitorio en *Salmonella*. En el caso del zumo de naranja, destacan el ácido málico en concentraciones de 955 mg/100 ml, el ácido cítrico de 160 mg/100 ml y el ácido ascórbico (Vitamina C) de 53 mg/100 ml (Farnworth et al., 2001).

En las últimas décadas, se han producido varios brotes de salmonelosis asociados al consumo de zumo de naranja sin pasteurizar. Entre los documentos destacan brotes de *Salmonella* Typhimurium con centenares de afectados, como los de 1999 y 2005 en Australia y Estados Unidos, resultando entre ambos 557 personas contagiadas. Aunque es menos frecuente, algunos de estos brotes también causan muertes como el generado por *S. Muenchen* que en 1999 causó un brote con 398 infectados y 1 fallecido. (Raybaudi-Massilia et al., 2009). No solo se pueden producir brotes por *Salmonella* no-tifoidea, sino que también han sido descritos casos de contagio por *S. Typhi* con fallecidos. Si bien el número de casos documentados es bajo en los países desarrollados, se estima que la relevancia (y mortalidad) de los mismos es mucho más elevada en países en vías de desarrollo (Danyluk et al., 2012).

Aunque tradicionalmente los zumos se han pasteurizado mediante un tratamiento térmico para prolongar su vida útil, además de aplicar otras barreras como el control de pH, la refrigeración y el uso de conservantes, es bien conocido que estos tratamientos afectan a las cualidades sensoriales y

nutritivas de los zumos. Por ello, en la actualidad hay una tendencia a reducir la intensidad de los tratamientos, o a sustituirlos por nuevos métodos como el procesamiento con altas presiones (HHP), radiación ultravioleta, campos de pulsos eléctricos (PEF) y atmósferas de CO₂ (Marín et al., 2014).

En cuanto a los criterios sanitarios establecidos para *Salmonella* en Europa, no existe una legislación específica para zumos. La normativa europea está recogida en el Reglamento 2073/2005, y establece que *Salmonella* debe estar ausente en 25 gramos de alimentos como carnes, lácteos o pescados, entre otros (Comisión Europea, 2005). En cambio, en Estados Unidos sí está legislada la seguridad sanitaria de los zumos, ya que la *Food and Drug Administration* (FDA) puso en marcha el plan “Hazard Analysis and Critical Control Point” (HACCP). Esta normativa exige a los productores de zumo aplicar un tratamiento que resulte en una reducción de 5 ciclos logarítmicos de la concentración del microorganismo pertinente. Se entiende por pertinente el microorganismo más propenso a aparecer en cada tipo de zumo, entre los cuales *Salmonella* es el considerado para los zumos cítricos. Esta regulación es obligatoria para EE.UU. y para todos los exportadores, por lo que se aprecia claramente la relevancia que tiene el control de *Salmonella* en la seguridad del zumo de naranja (Danyluk et al., 2012).

En el futuro, se espera que las intoxicaciones causadas por alimentos frescos y zumos vayan en aumento. Los altos valores nutritivos de los vegetales y la fruta han convertido a estos productos en fundamentales dentro de la dieta humana. Además, se observa un cambio de tendencia en el estilo de vida que deriva hacia el consumo de alimentos procesados listos para ser consumidos. Entre estos productos, los zumos se encuentran entre los más demandados (Chai, 2013). Si estos zumos no han sido correctamente pasteurizados o refrigerados, o si se distribuyen frescos, cada vez más frecuente, existe un riesgo alto de infección por *Salmonella*. Por tanto, la mejora de los procesos de control y seguridad alimentaria es fundamental.

1.4. El análisis de riesgo como herramienta para cuantificar el riesgo de *Salmonella* en alimentos.

Como ya se ha indicado en el caso de *Salmonella*, las enfermedades transmitidas por los alimentos continúan causando a día de hoy numerosos problemas a nivel humano y económico, tanto en países desarrollados como en desarrollo. El gran avance científico acerca de los peligros de estas enfermedades junto con la capacidad de intervención del sector público y privado, deberían reducir los riesgos relacionados con los alimentos. Sin embargo, en muchas ocasiones no se ha abordado la forma de relacionar ni de cuantificar el riesgo de los alimentos respecto a las enfermedades ocasionadas en las personas. Con el fin de evaluar y gestionar estos peligros, durante las tres últimas décadas se ha desarrollado una metodología sistemática denominada análisis de riesgos. Sus principales usos son la estimación de riesgos para la salud, identificación y aplicación de medidas adecuadas para controlar los riesgos y mejora de la normativa y los sistemas de control de los alimentos, entre otros. A nivel de la cadena alimentaria, el análisis de riesgos no sólo permite identificar los riesgos asociados a un determinado alimento, sino también qué medidas adoptar frente a ellos e identificar los diferentes puntos de control de la cadena donde podrían aplicarse dichas medidas, ofreciendo un marco probabilístico del impacto de dichas medidas. El análisis de riesgos está constituido por tres componentes: gestión de riesgos, evaluación de riesgos y comunicación de riesgos. Inicialmente, estos análisis eran de tipo cualitativo o semi-cuantitativo, como por ejemplo la probabilidad alta o baja de producir enfermedad. No obstante, debido al aumento del conocimiento científico y a su mayor flexibilidad, actualmente se tiende a trabajar con modelos cuantitativos. El principal obstáculo para el desarrollo de estos modelos es que deben ser muy específicos y deben tener un adecuado diseño experimental, ya que los resultados obtenidos deben plasmar fielmente la realidad de la cadena alimentaria en estudio (OMS, 2007).

De acuerdo con la FAO (2002), un análisis de riesgo alimentario se desarrolla en cuatro pasos. El primero de ellos es la identificación del riesgo, en el que se detecta el agente biológico presente en el alimento que afecta a la salud humana. En segundo lugar, se realiza una caracterización del peligro, cuantitativa o no, mediante la cual se estudian las características patogénicas y de resistencia del agente biológico. En tercer lugar, se lleva a cabo una evaluación de la exposición, la cual consiste en

analizar la ingesta del patógeno a través del alimento y de otras fuentes. Por último, se realiza la caracterización del riesgo, que consiste en estimar la probabilidad de que ocurran efectos adversos en la salud de una población determinada, utilizando como referencia los datos obtenidos en los tres primeros pasos.

En lo relativo a *Salmonella*, se han realizado y publicado numerosos análisis de riesgo sobre este género bacteriano, siendo uno de los riesgos microbianos transmitido por los alimentos con más estudios realizados de este tipo. Entre los grandes análisis de riesgo efectuados, destacan aquellos desarrollados para estudiar la presencia del microorganismo en huevo, carne de pollo o cerdo (Hill et al., 2010; Oscar, 2004). Sin embargo, estos análisis se han restringido casi completamente a *S. Enteritidis* y *Typhimurium*, siendo muy escasos para el resto de tipos de *Salmonella*, lo que los hace insuficientes para efectuar un análisis de riesgo cuantitativo de forma precisa (al menos en algunos casos). A su vez esto es debido a que, a día de hoy, todavía existen grandes lagunas de conocimiento en relación a diversos aspectos de la fisiología de *Salmonella*, como, por ejemplo, en relación a la resistencia al estrés y la capacidad de crecimiento o competición de las distintas serovariedades. Es cierto que se han realizado numerosos estudios acerca de la resistencia de *Salmonella* frente a distintos agentes de inactivación como el calor, el medio ácido, el estrés osmótico, las altas presiones o la radiación (Sherry et al., 2004). No obstante, los resultados de estos ensayos no son válidos para llevar a cabo un análisis de riesgo correcto debido su diseño experimental, no adecuado para este fin, la insuficiencia en el número de serovariedades o la elección inadecuada de las mismas. La solución pasa por diseñar estudios que permitan determinar de forma precisa la variabilidad intra-específica de la resistencia al estrés, la capacidad de crecimiento/competición y de la virulencia en el género *Salmonella*. Así, estos estudios deben ser realizados en medios y condiciones realistas que simulen las condiciones a las que se exponen las bacterias en la cadena alimentaria y en el tracto gastrointestinal.

A la hora de establecer los criterios sanitarios de *Salmonella*, las evidencias científicas sobre su patogenicidad y los tipos de métodos de detección condujeron a que en el Reglamento 2073/2005 europeo se estableciera que debía estar ausente en 25 gramos (en algunas excepciones 10 gramos) en multitud de alimentos como carnes, lácteos, productos vegetales y pescados, entre muchos otros (Comisión Europea, 2005). Esta regulación pretende ser eficaz a nivel práctico, pero tiene, entre otros inconvenientes, que equipara el riesgo de serovariedades muy patógenas para humano como *S. Typhimurium* con serovariedades adaptadas específicamente a otras especies animales, como *S. Gallinarum*. El desarrollo de nuevos estudios comparativos por medio del análisis del riesgo permitiría relacionar el riesgo relativo entre serovariedades, permitiendo crear una clasificación de seropatótipos y adecuar los criterios sanitarios a los riesgos reales de cada serovariedad. Otra ventaja que presenta el análisis de riesgo es que también permite establecer y combinar un amplio conjunto de valores para los distintos parámetros a los que está expuesta *Salmonella* en la cadena alimentaria y en el tracto gastrointestinal, a diferencia de la toma de decisiones basada en modelos determinísticos que se basa en un número bastante limitado de condiciones de ensayo. Esto permite adaptar los análisis a las condiciones concretas de cada cadena alimentaria, aumentando la validez de los resultados obtenidos. Por último, hay que considerar la robustez estadística del análisis de riesgos gracias a su extenso desarrollo probabilístico y al gran número de posibilidades que se estudian.

Por todos estos motivos, queda claro que el análisis de riesgos debe implantarse como una herramienta probabilística de estudio que, basada en modelos determinísticos y una vez adecuadamente validada, permitirá aumentar la seguridad alimentaria (como, por ejemplo en el caso de *Salmonella*).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Tal y como se ha explicado a lo largo de la introducción, *Salmonella* es una de las principales causas de infecciones alimentarias, siendo el zumo de naranja un potencial foco de contagio y para el que se considera el patógeno de referencia. Para controlar las infecciones alimentarias causadas por *Salmonella*, las autoridades han establecido diferentes criterios de proceso (número de ciclos de inactivación del patógeno de referencia) o sanitarios (nivel de contaminación máximo admitido). No obstante, cada vez resulta más evidente la necesidad de sustituir estas aproximaciones determinísticas por otras probabilísticas, basadas en análisis cuantitativos del riesgo, como base para garantizar la seguridad alimentaria. En cualquier caso, para poder llevar a cabo este tipo de análisis es necesario no sólo la adecuada definición de cada una de las “operaciones unitarias” o “módulos” y el estudio de las interacciones entre ellas, sino también la integración en las mismas (previo estudio) de la variabilidad intra-específica en resistencia, capacidad de crecimiento y/o virulencia dentro del género *Salmonella*.

Por ello, el objetivo principal fijado para el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado fue diseñar y validar (tanto *in-silico* como *in-vitro*) un modelo en módulos simulando la cadena de fabricación, almacenamiento y consumo de zumo de naranja, que permita realizar un análisis del riesgo relativo asociado al consumo de zumo de naranja que supondrían 5 cepas de otras tantas serovariedades de *Salmonella*.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Analizar la supervivencia de *Salmonella* frente a distintos agentes y tratamientos de inactivación, como incubación en zumo de naranja, calor o tránsito gastrointestinal.
2. Determinar las posibles interacciones existentes (desarrollo de respuestas de resistencia o sensibilización) entre los diferentes agentes o tratamientos de inactivación.
3. Realizar un análisis comparado del riesgo, tanto *in-silico* como *in-vitro*, de 5 cepas de *Salmonella* previamente seleccionadas en base a su resistencia, capacidad de crecimiento y virulencia en medios de laboratorio

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

A lo largo de esta investigación se han empleado un total de 5 cepas de *Salmonella*, las cuales se encuentran recogidas en la Tabla 1. Dichas cepas fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la Colección Inglesa de Cultivos Tipo (NCTC). La cepa *S. Typhimurium* SL 1344 fue cedida por el profesor Tim Brocklehurst, del Institute of Food Research de Norwich (Inglaterra). Las cinco cepas se mantuvieron congeladas en crioviales a -80 °C.

Tabla 1: Cepas de *Salmonella* empleadas y su procedencia.

Cepa	Fuente de procedencia
<i>S. Typhimurium</i> SL 1344	Tim Brocklehurst, IFR, Norwich.
<i>S. Enteritidis</i> 4155	CECT
<i>S. Enteritidis</i> 4396	CECT
<i>S. Enteritidis</i> 7236	CECT
<i>S. Kentucky</i> 5799	NCTC

3.2. Medios de cultivo, recuperación y tratamiento

Para la obtención de los cultivos bacterianos de las distintas cepas, se empleó el caldo de tripticasa-soja (TSB) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), suplementado con un 0,6% p/v de extracto de levadura (EL; Oxoid). Para la recuperación de las células de *Salmonella* tras los distintos tratamientos se utilizó el agar de tripticasa-soja (TSA; Oxoid), suplementado también con un 0,6% p/v

de EL (Oxoid). Adicionalmente, se utilizaron medios selectivos para la recuperación de las células y detectar el daño subletal tras el tratamiento. Para detectar la presencia de células dañadas en la membrana externa se utilizó el agar de Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD; Oxoid), un medio selectivo para enterobacterias que permite realizar una diferenciación morfológica de *Salmonella* por el color de las colonias y del medio, gracias a la capacidad que tiene de hidrolizar el tiosulfato (colonias negras) y descarboxilar la lisina (color final del medio rojo). También contiene sales biliares, que impiden el crecimiento de bacterias Gram-positivas y de aquellas bacterias con la membrana externa dañada. Por último, para detectar las células dañadas en la membrana citoplasmática se empleó TSA-EL (0,6%) + 4% NaCl (Panreac. Barcelona, España). Aquellos ensayos en los que la recuperación necesitara de diluciones seriadas de la muestra, el diluyente usado fue agua peptona tamponada (APT; Oxoid). Los medios se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y se esterilizaron durante 20 minutos a 121 °C en un autoclave Presoclave III (Selecta, Abrera, Barcelona, España), salvo el agar XLD que simplemente se llevó a ebullición, y se mantuvo a 50 °C hasta su uso.

Para la simulación de la cadena alimentaria, y medio de tratamiento, se utilizó zumo de naranja de la marca Juver (Juver Alimentación, Murcia, España), con pH=3,3, y un alimento simulado (2x), compuesto por mucina 4 g/l, proteosa-peptona 8,3 g/l y D-glucosa 3,5 g/l.

3.3. Obtención de suspensiones microbianas

A partir de las cepas almacenadas en crioviales a -80 °C, se realizaron siembras por agotamiento en placas de TSA-EL y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una estufa estática modelo Incubing (Selecta, Abrera, Barcelona, España). Tras esto, se preparó el precultivo partiendo de una colonia aislada de la estría y se inoculó en 100 µl de TSB-EL contenidos en un pocillo de una placa microtiter de 96 pocillos (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca). Esta placa se incubó 24 horas a 37 °C en condiciones estáticas. Pasado este tiempo, 1 µl de precultivo se inoculó en 100 µl de TSB-EL fresco, haciendo una dilución 1:100. Tras 24 horas en incubación a 37 °C se alcanzó un cultivo con una densidad celular de aproximadamente 10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml.

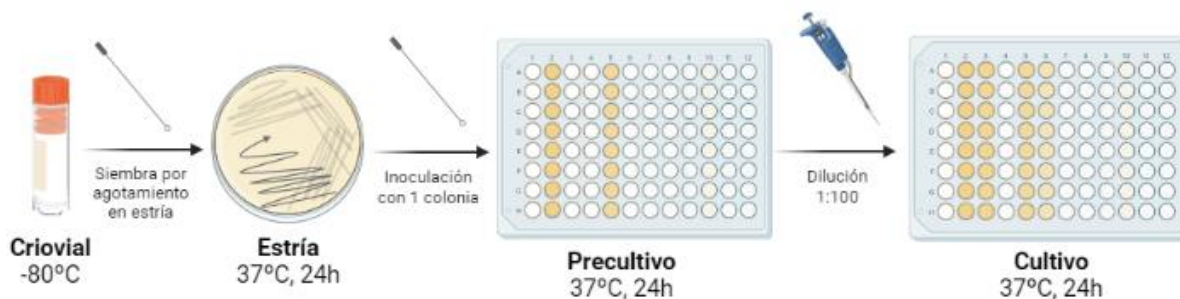


Figura 1: Esquema del procedimiento de preparación de cultivos bacterianos de *Salmonella*. Fuente: Biorender.

3.4. Obtención de cultivos celulares.

Para realizar los ensayos de virulencia, se utilizó la línea celular CaCo-2, una línea de adenocarcinoma de colon humano, cedida por Dr. Edith Brot-Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, France) en el pase 25, y los experimentos fueron realizados entre el pase 34-36. Estas células son adherentes, tienen una tasa de duplicación de 62 horas, y se recomienda no trabajar con ellas por encima del pase 50. La obtención de estos cultivos se llevó a cabo en el Servicio de Cultivos Celulares del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

Las células fueron crecidas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium + GlutaMAXTM (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de Medio Mínimo Esencial con aminoácidos no esenciales (MEM NEAA; Invitrogen) y 1% de penicilina y estreptomycin (100 unidades de penicilina/ml y 10 µg/ml de estreptomycin, Invitrogen). Una vez que las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se disociaron con tripsina al 0,05%-1 mM de EDTA (Invitrogen) y se sembraron a una densidad de aproximadamente 15.000 células por pocillo en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc, Francia), 200 µl de medio completo por pocillo. Las placas se

incubaron en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO₂ a 37 °C durante 15-17 días para obtener las células totalmente diferenciadas. El medio de cultivo se sustituyó cada 2 días y la confluencia celular se confirmó mediante microscopía óptica. Tras esto, los cultivos ya estuvieron listos para ser empleados en los ensayos de invasión.

3.5. Tratamientos

3.5.1. Tratamiento térmico

La determinación de la resistencia al calor se llevó a cabo en un termorresistómetro TR-SC (Condón et al., 1993). El equipo consta de un vaso de acero inoxidable de 400 ml dotado de una resistencia eléctrica para el calentamiento del medio de tratamiento, un sistema de refrigeración, un sistema de agitación para garantizar la homogeneidad de la temperatura y del inóculo, un orificio de inyección para inocular la suspensión y un tubo de extracción para la toma de muestra. Para llevar a cabo los tratamientos térmicos, el equipo se programó a distintas temperaturas entre 56 °C y 60 °C. Una vez alcanzada y estabilizada la temperatura, se inyectaban 0,2 ml de la suspensión microbiana mediante una jeringuilla semi-automática (Hamilton Company, Reno, Nevada, EE.UU.) en el medio de tratamiento, zumo de naranja. Tras esto, las muestras eran extraídas a determinados tiempos de tratamiento, e inmediatamente después eran sembradas en placa e incubadas en una estufa a 37 °C para su posterior recuento.

3.5.2. Tratamiento con fluido gástrico e intestinal

Las células de *Salmonella* se expusieron a un modelo de digestión *in vitro* simulado que constaba de dos fases, una fase gástrica, Fluido Gástrico Simulado (SGF), y una fase intestinal, Fluido Intestinal Simulado (SIF), para simular las condiciones gastrointestinales. Se utilizó un modelo estandarizado de digestión *in vitro* en estático descrito por Minekus et al. (2014).

La composición del SGF (1,25x) fue 6,9 ml de KCl 37,3 g/l, 0,9 ml de KH₂PO₄ 68 g/l, 12,5 ml de NaHCO₃ 84 g/l, 11,8 ml de NaCl 117 g/l, 0,4 ml de MgCl₂(H₂O)₆ 30,5 g/l y 0,5 ml de (NH₄)₂CO₃ 48 g/l. 5 partes de alimento, alimento simulado o zumo de naranja, fueron mezcladas con 4 partes de la solución electrolítica (SGF) para obtener una proporción final de alimento: SGF 50:50 (v/v) después de añadir lisozima (0,1 g/l), pepsina (2000 U/l), CaCl₂ 0,075 mM y agua en la mezcla final. Esta mezcla final se ajustó a pH 3.0 con HCl 1M.

A modo de ejemplo, para preparar 6 ml de la mezcla final de alimento y SGF, a 3 ml de alimento simulado/zumo de naranja se le añadieron 2,4 ml de SGF 1,25x, que contenían 0,12 ml de lisozima 5 mg/ml y 17,27 mg de pepsina (695 U/mg), junto con 1,5 µl de CaCl₂ 0,3 mM, 53 µl de HCl 3M y 545,5 µl de agua destilada.

La composición del SIF (1,25x) fue 6,8 ml de KCl 37,3 g/l, 0,8 ml de KH₂PO₄ 68 g/l, 42,5 ml de NaHCO₃ 84 g/l, 9,6 ml de NaCl 117 g/l y 1,1 ml de MgCl₂(H₂O)₆ 30,5 g/l. 5 partes de la muestra proveniente del SGF fueron mezcladas con 4 partes de la solución electrolítica (SIF) para obtener una proporción final de muestra SGF : SIF 50:50 (v/v) después de añadir tripsina (1324 U/mg), α-quimotripsina (55 U/mg), α-amilasa (10 U/mg), lipasa (440 U/mg), sales biliares (100 mg/ml), CaCl₂ 0,075 mM y agua destilada en la mezcla final.

Para preparar 6 ml de la mezcla final de muestra tratada con SGF y SIF, a 3 ml de muestra SGF se le añadieron 2,4 ml de SIF 1,25x, que contenían 113 µl de tripsina 4 mg/ml, 500 µl de quimotripsina 5,46 mg/ml, 600 µl de amilasa 400 mg/ml y 500 µl de lipasa 54,54 mg/ml, junto con 6 µl CaCl₂ 0,3 mM, 245 µl de sales biliares 100 mg/ml y 349 µl de agua destilada.

La simulación gastrointestinal se llevó a cabo en placas microtiter de 96 pocillo. Cada fase tuvo una duración de 2 horas a 37 °C en un incubador FX (Zeulab S.L. Zaragoza, España). Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo, se diluyeron si procedía, y se sembraron en placas de TSA y XLD.

3.5.3. Adhesión e invasión a células intestinales.

Antes de comenzar los ensayos de virulencia y una vez alcanzada la confluencia celular de las CaCo-2, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células tres veces con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) atemperado a 37 °C. Una vez lavadas, se añadieron las células de *Salmonella* a una concentración de 10⁶ UFC/ml y se incubaron 30 minutos a 37 °C, 5% CO₂. Tras la incubación, se eliminaron las bacterias no adheridas mediante tres lavados con DPBS, se añadió DMEM-gentamicina 100 µg/ml (200 µl/pocillo) para inactivar las bacterias extracelulares y se incubó con durante 1 hora a 37 °C, 5% CO₂.

Después de la incubación, para lisar las células CaCo-2 se trataron con 0,1% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos. Por último, se sembraron estos lisados en placas de TSA-El y XLD, realizando diluciones seriadas si fueran necesarias. Para calcular la tasa de invasión se calculó el porcentaje de células capaces de invadir las células epiteliales respecto al número de bacterias iniciales.

3.6. Recuperación y recuentos microbianos

Tras los diferentes tratamientos, las placas de TSA-EL, TSA-EL + 4 % NaCl o XLD sembradas se incubaron en una estufa modelo Incubig (JP Selecta S.A., Abrera, Barcelona, España) a 37 °C durante 24-48 horas. El recuento de las placas sembradas en superficie se realizó manualmente, y el recuento de las placas sembradas por homogeneización en masa se realizó con un contador automático de colonias por análisis de imagen, construido por el grupo de investigación Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria en colaboración con el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Zaragoza.

3.7. Análisis de los datos

Todos los ensayos se llevaron a cabo al menos por triplicado en días independientes de trabajo. Las curvas de supervivencia se obtuvieron representando el logaritmo del número de supervivientes (Log N_t) frente al tiempo. Algunas de estas curvas mostraron desviaciones de la linealidad, observándose fenómenos de hombro y/o cola, de forma que fue necesario utilizar un modelo que permitiese su descripción. El modelo escogido para calcular los parámetros de inactivación fue el modelo de Geeraerd hombro-cola (Geeraerd et al., 2000) y se modelizaron mediante el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE.UU.). El modelo viene definido por las siguientes ecuaciones, la ecuación 1 describe aquellas curvas con fenómenos de hombro y la ecuación 2 adaptada para describir los fenómenos de cola.

$$N_t = N_0 * e^{-k_{max} * t} * \left(\frac{e^{k_{max} * S_l}}{1 + (e^{k_{max} * S_l} - 1) * e^{-k_{max} * t}} \right)$$

Ecuación 2

$$N_t = (N_0 - N_{res}) * e^{-k_{max} * S_l} + N_{res}$$

Ecuación 1

Donde N_t representa la concentración final de células (UFC/ml), N₀ la concentración inicial de células (UFC/ml) y t representa el tiempo de tratamiento. El modelo describe las curvas de supervivencia mediante tres parámetros: la longitud de hombro (S_l; unidades de tiempo), la velocidad específica de inactivación (K_{max}; 1/unidad de tiempo) y N_{res}, concentración residual de células. A partir de estos parámetros, el tiempo de reducción decimal (D) se calculó a partir de K_{max} mediante la ecuación 3.

$$Valor D = \frac{2,303}{k_{max}}$$

Ecuación 3

El valor promedio y la desviación estándar de todos parámetros obtenidos se calculó mediante Excel (Microsoft Co., Redmond, Washington, EE.UU.). Las comparaciones estadísticas se realizaron con el software GraphPad Prism mediante el test de t-Student y/o de ANOVA, y posttest de Tukey, considerando un nivel de significación del 0,05.

3.8. Análisis de riesgo

El tratamiento probabilístico necesario para llevar a cabo el análisis *in silico* del riesgo se llevó a cabo mediante @RiskTM (Palisade Corp., Newfield, New York, EE.UU.), un software que permite realizar análisis probabilísticos mediante la simulación Monte Carlo. Esta técnica Monte Carlo simula y reproduce secuencias de eventos que podrían ocurrir en un sistema real.

Para efectuar el análisis probabilístico, el programa requirió que se establecieran los módulos en los que se dividió el proceso objeto de estudio (*ver sección 4*), se determinaran experimentalmente las ecuaciones matemáticas que gobernaban cada proceso y los valores de las variables independientes para cada cepa estudiada y, por último, que se definieran las distribuciones de probabilidad de dichas variables independientes para cada uno de los procesos/módulos. Una vez establecido todo el software comienza a hacer tandas de análisis llamadas iteraciones. En cada iteración, el programa selecciona para cada parámetro un valor en función de la distribución probabilística. Como resultado final para cada iteración, se obtendrá un valor numérico producto del cálculo matemático de las ecuaciones de todo el modelo, utilizando los parámetros obtenidos por probabilidad. Al repetir el proceso, otros valores se seleccionarán por probabilidad y se obtendrá un resultado final distinto. Tras cientos de iteraciones se obtiene una distribución que representa el rango de valores de parámetro posibles, y, en nuestro caso, la probabilidad para cada uno de ellos de producirse infección por *Salmonella* tras la ingestión de zumo de naranja.

El resultado del análisis del riesgo modelo de proceso en módulos planteado para este ensayo no solo fue simulado mediante el análisis de riesgos, sino que también se validó (sólo una condición por módulo) experimentalmente en el laboratorio. Los resultados obtenidos en el experimento real fueron comparados con aquellos obtenidos en el análisis de riesgo, con el objetivo de valorar si la simulación con @RiskTM se ajustaba a lo que realmente ocurre *in vitro*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer paso dentro de esta investigación fue definir un proceso que simulara las condiciones reales de producción, almacenamiento y consumo del zumo de naranja contaminado y que se utilizaría posteriormente como modelo para estimar el riesgo relativo asociado a 5 cepas de *Salmonella*, que fueron seleccionadas por sus características fenotípicas (diferencias en resistencia al calor medio ácido e invasividad en cultivo celular) previamente determinadas (Guillén et al., enviado para publicación). El proceso se estructuró con la forma de un modelo en módulos, lo que permitió delimitar y caracterizar las etapas más representativas de la cadena alimentaria, desde la posible contaminación y almacenamiento refrigerado, pasando por los tratamientos de descontaminación (tratamientos térmicos), el tránsito gastrointestinal y acabando en la infección (invasión) de células epiteliales del intestino. El modelo en módulos diseñado se puede observar en la figura 2.

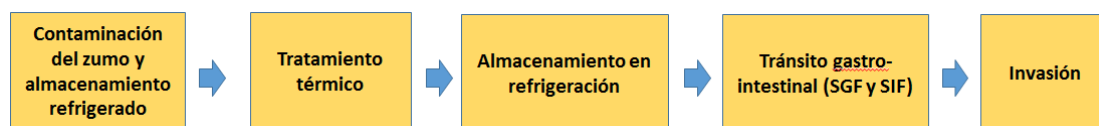


Figura 2: Modelo en módulos diseñado para esta investigación.

La caracterización de cada uno de los módulos es, por lo tanto, el primer paso para poder llevar a cabo el análisis completo de la cadena. Así, en primer lugar, se presentarán los resultados de los ensayos encaminados a caracterizar la supervivencia y/o capacidad de invasión de las diferentes cepas de *Salmonella*. En concreto, estos experimentos se centraron en:

- Determinar la supervivencia de *Salmonella* en zumo de naranja a 4 °C.
- Determinar la resistencia de *Salmonella* a los tratamientos térmicos.
- Determinar la supervivencia de *Salmonella* al SGF.
- Determinar la capacidad de invasión celular de *Salmonella*.

Estas determinaciones se realizaron para las cinco cepas bacterianas objeto de estudio, si bien es cierto que para algunos ensayos (por ejemplo, para evaluar la influencia de la concentración microbiana en la resistencia a determinados agentes) tan sólo se empleó *S. Typhimurium* SL1344, que se seleccionó como cepa modelo.

4.1. Caracterización de la capacidad de resistencia e invasión de las cepas de *Salmonella*.

4.1.1. Supervivencia de las células de *Salmonella* en zumo de naranja a 4 °C.

La capacidad de supervivencia en zumo de naranja a 4 °C de las 5 cepas de *Salmonella* fue determinada, estudiando el efecto de la incubación en el zumo durante 7 días. Los resultados se recogen en la figura 3. Por una parte, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los recuentos a lo largo de los 7 días en las cepas *S. Enteritidis* 4396 y 7236. Por otra parte, en las cepas *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis* 4155 y *S. Kentucky* tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los recuentos de los primeros 2 días, pero sí a partir del día 3. Dado que en la industria es muy poco frecuente que los periodos pre-procesado superen los dos días en adelante se fijó este como máximo periodo de exposición pre-procesado de *Salmonella* al zumo de naranja en refrigeración.

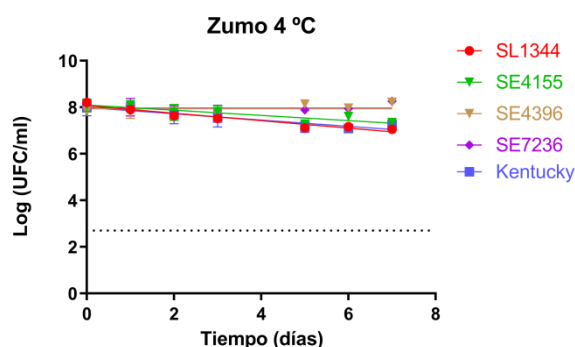


Figura 3: Gráficas de supervivencia de las diferentes cepas de *Salmonella* en zumo de naranja a 4°C de 5 cepas de *Salmonella*.

En relación a estos resultados hay que señalar que el zumo de naranja es un alimento que posee un pH de alrededor de 3,0, un valor alejado del pH=7,0-7,5 óptimo para el crecimiento de *Salmonella*. Por lo tanto, la acidez del medio podría ser una causa de inactivación bacteriana, aunque es sabido que *Salmonella* es capaz de desarrollar mecanismos de resistencia a medio ácido (Álvarez-Ordóñez et al., 2012). Respecto a la temperatura de almacenamiento a 4 °C, se sabe que a pesar de ser un microorganismo mesófilo *Salmonella* es capaz de sobrevivir durante largos periodos de refrigeración (Lake et al., 2002). En este sentido los resultados obtenidos concuerdan con los que, inicialmente se podían prever. No obstante, hay que señalar que en experimentos realizados en paralelo se verificó que al aumentar la temperatura de conservación (hasta 25 °C) la velocidad de inactivación de *Salmonella* en zumo aumentó notablemente. Esto que, en un principio, podría considerarse como una herramienta para aumentar la seguridad en relación a *Salmonella* también conduce a la aceleración de los procesos de degradación química, enzimática y microbiológica (mohos) del zumo y por ello no se puede aplicar en condiciones reales.

4.1.2. Resistencia a tratamiento térmico

En primer lugar, se estudió la termorresistencia de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 en zumo de naranja. La figura 4 muestra las gráficas de supervivencia a diferentes temperaturas, 54 °C, 56 °C, 58 °C y 60 °C, que se obtuvieron tras representar el logaritmo del número de supervivientes (Nt) frente al tiempo de tratamiento (en segundos). A pesar de que la mayor parte de las gráficas de supervivencia presentaron un perfil próximo a la linealidad, hubo casos en los que se observó la presencia de fenómenos de hombro. Dada la presencia de estos fenómenos fue necesario utilizar una ecuación no lineal que permitiese su descripción, utilizándose el modelo de Geeraerd. Este modelo describe la cinética de inactivación de una población microbiana en función de tres parámetros

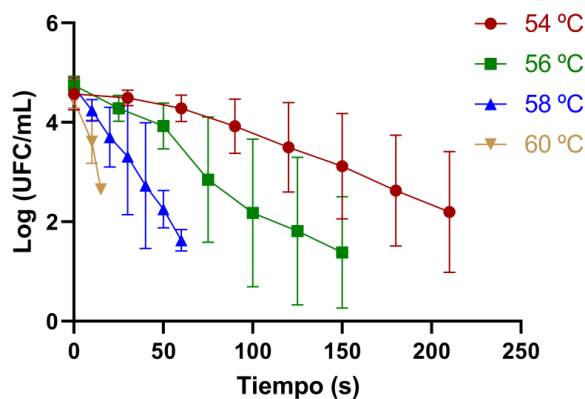


Figura 4: Curva de inactivación de los recuentos obtenidos para los tratamientos térmicos de *S. Typhimurium* SL1344 a distintas temperaturas.

básicos: la duración de los hombros, el nivel de inactivación al que aparecen las colas y la velocidad de inactivación en la porción central de la curva, que se considera lineal. En la tabla 2 se muestran los parámetros obtenidos para las diferentes temperaturas y la bondad de los ajustes.

A partir de ellos se pudo determinar además el valor Z , el número de grados centígrados que hay que aumentar la temperatura para reducir el valor de D a la décima parte, que fue de 4,49 °C, un valor similar a los determinados previamente para *Salmonella* (Guillén et al., 2020).

Tabla 2: Parámetros obtenidos y bondad del ajuste tras la modelización con el modelo de Geeraerd de las curvas de inactivación de *S. Typhimurium* SL1344 en zumo de naranja a diferentes temperaturas.

Temperatura	54 °C		56 °C		58 °C		60 °C	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
D (s)	59,30	16,10	29,14	8,57	10,29	3,90	2,76	0,97
S_I (s)	76,93	33,46	45,50	27,11	13,88	15,13	9,94	1,31
R^2	0,983	0,008	0,975	0,011	0,984	0,013	0,959	0,026
RMSE	0,174	0,113	0,267	0,154	0,212	0,060	0,440	0,070

SD: Desviación estándar

Por razones metodológicas, se seleccionó la temperatura de 56 °C para caracterizar la resistencia al tratamiento térmico del resto de cepas de *Salmonella* del estudio. En la figura 5 se muestran las curvas de supervivencia de *S. Enteritidis* 4155, 7236, 4396 y *S. Kentucky*. Los resultados muestran cómo la inactivación térmica varió ligeramente dependiendo de la cepa. Esto también se puede comprobar al observar los valores D y S_I de las diferentes cepas (Figura 5 y Tabla 3).

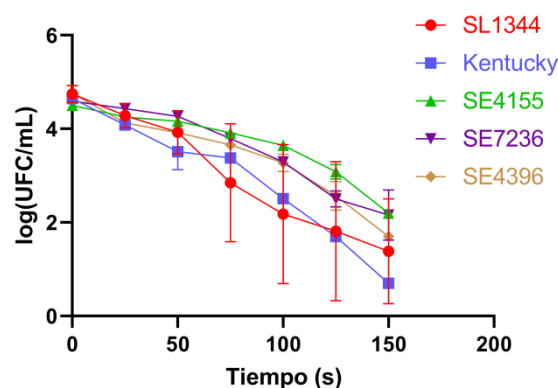


Figura 5: Gráficas de supervivencia a 56 °C de *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis* 4155, *S. Enteritidis* 4396, *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky* 5799

Tabla 3: Parámetros obtenidos y bondad del ajuste tras la modelización con el modelo de Geeraerd de las curvas de inactivación de las cepas *S. Enteritidis* 4155, *S. Enteritidis* 4396, *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky* 5799.

Cepa	SE 4155		SE4396		SE7236		Kentucky	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
D (s)	36,87	4,66	47,89	2,72	43,26	10,88	30,46	0,54
S_I (s)	74,87	13,74	26,79	3,99	43,57	10,70	22,72	22,07
R^2	0,977	0,003	0,949	0,022	0,987	0,012	0,994	0,008
RMSE	0,147	0,002	0,258	0,093	0,113	0,052	0,185	0,086

SD: Desviación estándar

4.1.3. Resistencia al SGF y SIF

Por otra parte, para estudiar la resistencia de cada cepa al tránsito gastrointestinal humano, las células de *Salmonella* se expusieron a un fluido gástrico e intestinal simulado. Los ensayos de caracterización se realizaron en 5 cepas de *Salmonella*. Los resultados, recogidos en la figura 7, mostraron cómo las

respuestas al tratamiento difieren entre las distintas cepas. En el SGF se observó una inactivación menor de 1 ciclo logarítmico para todas las cepas. En cuanto al SIF, no se observó inactivación significativa en ninguna de las cepas (datos no mostrados). Estos resultados indican que *Salmonella* (su supervivencia) se verá afectada por el SGF (debido a su bajo pH),

pero apenas se inactivará por el SIF. En la tabla 4 se muestran los parámetros obtenidos para cada cepa y la bondad de los ajustes.

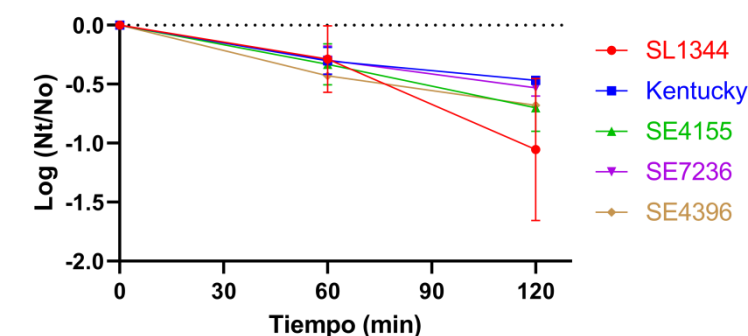


Figura 6: Gráficas de supervivencia de *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis* 4155, *S. Enteritidis* 4396, *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky* 5799 frente al SGF.

Tabla 4: Parámetros obtenidos y bondad del ajuste tras la modelización con un modelo lineal de las curvas de inactivación en SGF de las cepas *S. Typhimurium* 1344, *S. Enteritidis* 4155, *S. Enteritidis* 4396, *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky* 5799.

Cepa	SL1344		SE 4155		SE4396		SE7236		Kentucky	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
D (min)	136,3	87,7	181,5	54,0	166,0	14,7	228,4	30,4	267,0	11,6
R²	0,89	0,09	0,985	0,004	0,91	0,08	0,98	0,01	0,90	0,07
RMSE	0,17	0,11	0,058	0,015	0,108	0,058	0,04	0,03	0,05	0,02

SD: Desviación estándar

4.1.4. Caracterización de la capacidad de invasión celular

Con el objetivo de caracterizar la capacidad de invasión celular, se llevaron a cabo ensayos de invasión con las 5 cepas de *Salmonella* en cultivos de células CaCo-2, según se describe en material y métodos. Los resultados se muestran en la figura 8, la capacidad de invasión se representó en forma de porcentaje, el cual se calculó como el % de células capaces de invadir el cultivo en relación al número de células añadidas al pocillo. Los porcentajes de invasión alcanzados fueron muy diversos entre las 5 cepas. Las cepas más invasivas resultaron ser *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky*, con unos porcentajes de invasión considerablemente altos. *S. Typhimurium* SL1344 y *S. Enteritidis* 4155 presentaron una capacidad invasiva intermedia, mientras que *S. Enteritidis* 4396 resultó ser la cepa con menor porcentaje de invasión. Estos resultados contrastan con los resultados de Howe et al. (2017), que mostraron una mayor capacidad invasiva de *S. Typhimurium* frente a *S. Kentucky*, aunque hay que señalar que las cepas investigadas fueron distintas.

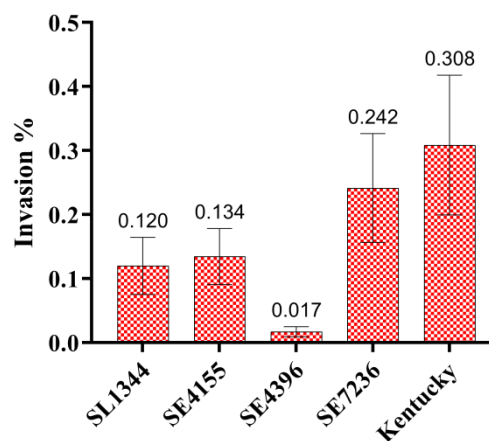


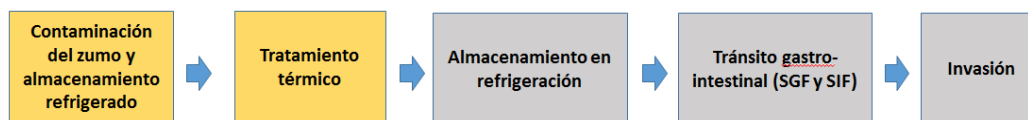
Figura 7: Capacidad de invasión (en %) de células CaCo-2 de *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis* 4155, *S. Enteritidis* 4396, *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky* 5799.

4.2. Estudio de las posibles interacciones entre agentes o tratamientos

Una de las mayores limitaciones y/o problemas del análisis del riesgo por módulos es que no suele tener en cuenta las posibles “interacciones” entre los mismos o dicho de otra forma, el impacto que la exposición a un agente puede tener en los procesos sucesivos. Así, el objetivo de esta segunda fase del

trabajo fue determinar si la exposición a un agente o tratamiento podría condicionar la supervivencia (aumentándola o disminuyéndola) bacteriana frente a los sucesivos o la capacidad de invasión. Para llevar a cabo esta parte del estudio se seleccionó como modelo *S. Typhimurium* SL1344.

4.2.1. Efecto de la incubación en zumo en la resistencia a tratamiento térmico.



Para evaluar la influencia de la incubación en zumo de naranja en la posterior termorresistencia, se llevó a cabo un ensayo donde se expusieron las células de *Salmonella* a diferentes tiempos de incubación en zumo de naranja a 4 °C (0 horas o control, 1 hora y un día) y posteriormente se determinó su termorresistencia a 56 °C. Los resultados obtenidos, recogidos en la figura 9, muestran cómo no hay un efecto de la incubación en zumo de naranja en la termorresistencia. En las curvas de 56 °C se observó como la incubación en zumo de naranja durante 1 hora y/o 1 día no varió la termorresistencia respecto a la muestra control. Estos resultados sugieren que una incubación en zumo de naranja a 4 °C de las células de *Salmonella*, en los tiempos aquí expuestos, no genera una respuesta adaptativa que aumente la posterior termotolerancia. Otros estudios llevados a cabo en *Salmonella* muestran como una exposición prolongada a pH bajo termina generando una adaptación celular a medio ácido, que sí que incrementa de forma significativa la termorresistencia (Mazzotta, 2001). Esto ratifica la necesidad de no mantener el periodo de pre-tratamiento más allá de las 24/48 horas, para evitar una adaptación a medio ácido que aumente la termorresistencia de *Salmonella*.

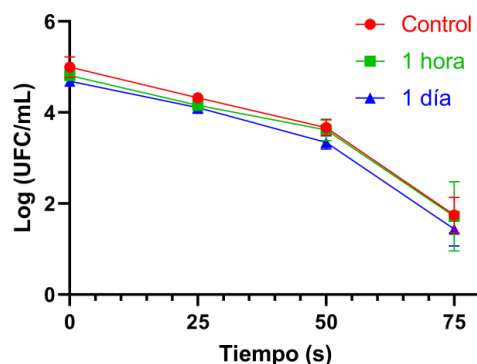
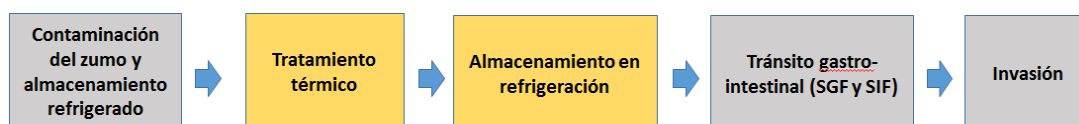


Figura 8: Gráficas de supervivencia a 56 °C de células de *S. Typhimurium* SL1344 expuestas a incubación en zumo de naranja a 4 °C durante 1 hora y un día, junto con un control recién inoculado.

4.2.2. Efecto del tratamiento térmico en la supervivencia en zumo de naranja.



Para evaluar el efecto del tratamiento en la supervivencia posterior en zumo de naranja, se trató térmicamente (aprox. un ciclo de inactivación) zumo de naranja inoculado a una concentración de 10^7 UFC/ml, y se almacenó a 4 °C durante 6 días (144 horas). Los resultados, recogidos en la figura 10, mostraron cómo el tratamiento térmico influía en la supervivencia posterior de *Salmonella* en zumo de naranja incubado a 4 °C. Tras 144 horas en zumo de naranja a 4 °C, el recuento en TSA descendió en aprox. 2,3 ciclos logarítmicos y en XLD en aprox. 2,5 ciclos. Esta inactivación observada en la incubación en refrigeración tras el tratamiento a 56 °C contrasta con lo observado cuando las células se inoculaban sin tratamiento térmico (no

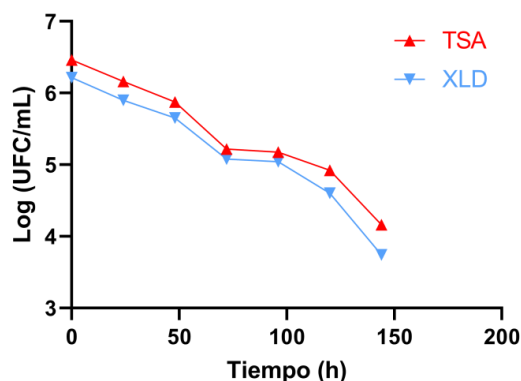
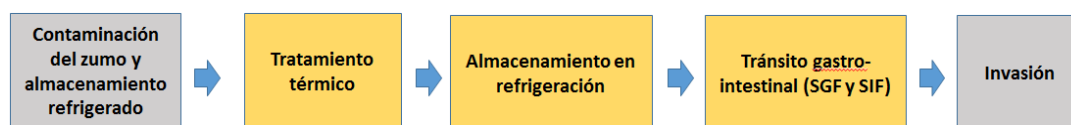


Figura 9: Gráficas de supervivencia a incubación en zumo a 4 °C de células de *S. Typhimurium* SL1344 durante 144 horas tras tratamiento térmico de 25 s a 56 °C.

se observaba inactivación), de lo que se deduce que el tratamiento térmico influye (negativamente) en la supervivencia posterior de las células de *Salmonella* en zumo de naranja a 4 °C. Adicionalmente, se incubó zumo tratado a 4 °C y a 25 °C (datos no mostrados), donde se observó una velocidad de inactivación mayor al aumentar la temperatura de incubación, pero no la diferencia entre los recuentos en TSA y XLD. Esto sugiere que el efecto del pH el zumo tras tratamiento térmico es mayor a 25 °C que a 4 °C. Además, estudios realizados han mostrado que el aumento de la temperatura de incubación incrementa la susceptibilidad posterior de *Salmonella* a medio ácido (Yang et al., 2014), por lo que la incubación a 25 °C tras tratamiento térmico, a pesar de sus inconvenientes, podría ser objeto de estudio en futuras investigaciones.

Resultados similares se obtuvieron con el resto de cepas, mostrando todas una velocidad de inactivación en zumo de naranja a 4° C (post- tratamiento térmico) similar y tras tratamientos térmicos de diferente intensidad (que condujeron a entre 0,5 y 2 ciclos logarítmicos de inactivación). Esto permitió determinar un valor *D* común para esta etapa de $66,62 \pm 12,44$ horas.

4.2.3. Efecto del tratamiento térmico e incubación en zumo de naranja en la supervivencia a SGF.



En este apartado se evaluó la influencia de la exposición a los tratamientos térmicos y del almacenamiento en refrigeración en la resistencia al SGF. El ensayo se llevó a cabo utilizando zumos de naranja inoculados 10^7 UFC/ml. Este ensayo solamente se realizó con SGF debido a que los ensayos preliminares mostraron que el SIF no afectaba a la supervivencia de *Salmonella*.

Por un lado, se inoculó zumo de naranja con *Salmonella* y se incubó a 4 °C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, las células de *Salmonella* se expusieron al SGF. Estos resultados se compraron con los de un zumo recién inoculado, denominado control. Tras la exposición al SGF la muestra control se inactivó $0,35 \pm 0,09$ ciclos logarítmicos en TSA y $0,70 \pm 0,13$ en XLD, mientras que en la muestra incubada 48 horas en zumo a 4 °C se inactivó $0,32 \pm 0,07$ ciclos logarítmicos en TSA y $0,71 \pm 0,09$ en XLD (resultados de TSA en figura 11). Por tanto, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) al comparar la supervivencia de *Salmonella* al SGF tras 48 horas con incubación en zumo de naranja a 4 °C con el control recién inoculado.

En base a estos resultados, se asume que durante las 48 horas de incubación en zumo de naranja a 4 °C, *Salmonella* no desarrolla mecanismos de adaptación al medio ácido, como anteriormente se ha comentado, que aumenten la capacidad de supervivencia al SGF. En el estudio llevado a cabo por Yuk y Schneider (2006), con cinco serovariedades distintas a las empleadas en este estudio, se

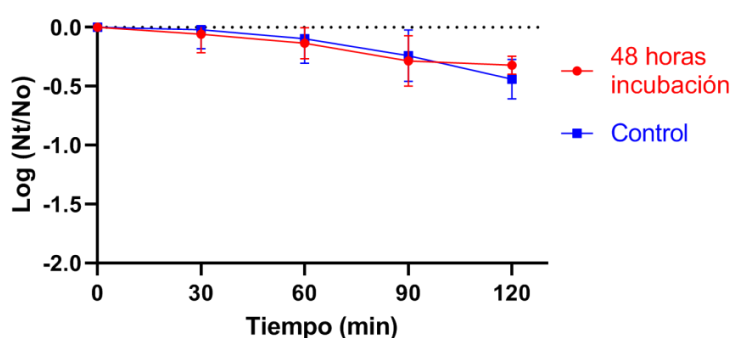


Figura 10: Gráficas de supervivencia a SGF de *S. Typhimurium* SL1344 control e incubada durante 48 horas en zumo de naranja a 4 °C.

demostró que la incubación durante 24 horas en zumo de naranja a 7 y 20 °C aumentó significativamente la supervivencia a SGF. Si bien los resultados de ambos estudios no son comparables pues las cepas, condiciones de crecimiento y, sobre todo, características del SFG, son muy diferentes, el estudio de Yuk y Schneider sí que claramente muestra que, al menos en algunas condiciones la exposición a entornos ácidos como el zumo de naranja puede generar un aumento de la supervivencia a SGF en *Salmonella*, algo que deberá ser tenido en cuenta para futuros estudios.

Por otro lado, también se comparó la resistencia al SGF de células tratadas térmicamente (56 °C durante 25 segundos) con las células control (recién inoculadas en zumo). Los resultados obtenidos, recogidos en la figura 12, mostraron cómo el tratamiento térmico previo no influye en la supervivencia de *Salmonella* a SGF. Así, al comparar los recuentos iniciales y a las 2 horas en TSA y en XLD de la muestra recién tratada y la muestra control a concentración inicial 10^7 UFC/ml, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas condiciones. Estos resultados sugieren que los posibles daños celulares ocasionados por el tratamiento térmico no influyen en la supervivencia a SGF, lo que contrasta con los resultados obtenidos en zumo. Esto podría ser explicado por la diferente duración de los ensayos (días frente a minutos) en zumo y SGF o a las diferencias en el tipo de estreses ácidos (orgánicos vs inorgánicos). En cualquier caso, este es otro aspecto que deberá ser estudiado en mayor profundidad.

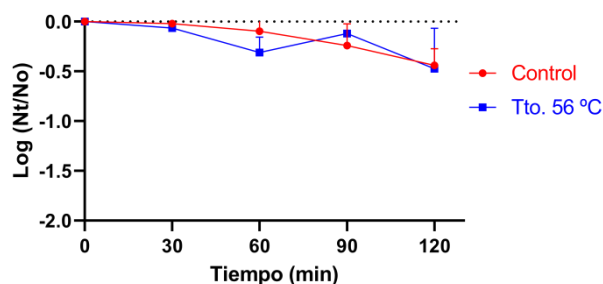
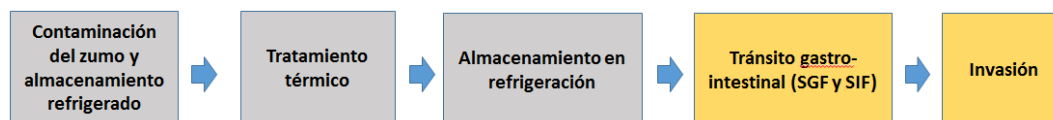


Figura 11: Gráficas de supervivencia a SGF de *S. Typhimurium* SL1344 control, tratadas térmicamente a 56 °C y tratadas térmicamente a 56 °C con incubación posterior de 24 horas en zumo de naranja a 4 °C.

4.2.4. Efecto del tránsito gastrointestinal en la invasión celular.



Para evaluar el efecto del tránsito gastrointestinal en la invasión celular, se llevó a cabo un ensayo en el que se incubó *S. Typhimurium* SL1344 en zumo durante 48 horas con un posterior tratamiento con SGF y SIF. Y se evaluó la capacidad de invasión a células CaCo-2 de las células supervivientes a este proceso. Estos resultados se compraron con los de un cultivo de *Salmonella* sin exponer al SGF y SIF. Los resultados, recogidos en la figura 13, mostraron cómo la capacidad de invasión disminuyó en la muestra incubada en zumo y tratada con fluidos gastrointestinales frente a la muestra control para las cepas *S. Kentucky* 5799 y *S. Enteritidis* 4155. Sin embargo, en el caso de *S. Enteritidis* 7236 se observó un aumento de la capacidad de invasión. En cualquier caso, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos, aunque esto podría ser, al menos en parte debido, a la variabilidad en los resultados experimentales observada. Esta ausencia de diferencias podría ser explicada por el hecho de que si bien los datos de la bibliografía indican la existencia de una relación inversa entre adaptación al medio ácido e invasividad en *Salmonella* (Guillén et al., 2021), el paso por el SIF revertiría este efecto, como ocurre también en condiciones fisiológicas.

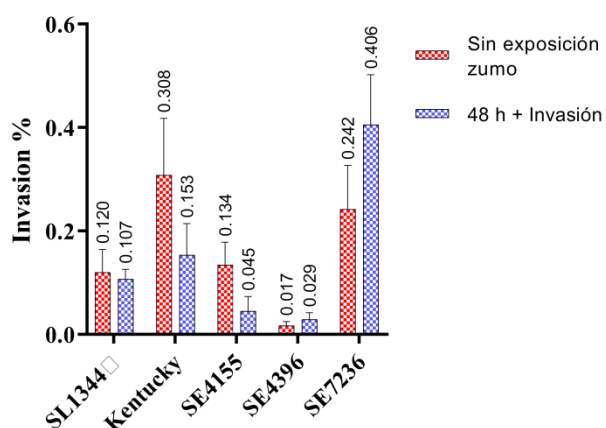


Figura 12: Capacidad de invasión de células de *S. Typhimurium* SL1344 sin exposición al SGF-SIF (control) y células expuestas al SGF-SIF tras una incubación de 48 horas en zumo de naranja a 4 °C.

4.3. Estudio de la influencia de la concentración celular en la resistencia a agentes o tratamientos.

Por último, un aspecto que también hay que tener en cuenta a la hora de efectuar comparaciones entre cepas, entre condiciones de tratamiento o al realizar análisis de riesgo es la posible influencia de la concentración celular en la supervivencia microbiana frente a determinados agentes (especialmente los agentes químicos). Esto es relevante porque, por ejemplo, si el tratamiento térmico afecta más a una cepa que a otra y, se verifica que la concentración celular influye en la muerte posterior en zumo refrigerado las diferencias en supervivencia entre esta cepa y otra más resistente al calor podrían ser mayores que las estimadas inicialmente. Así, en el caso que nos ocupa, aunque tanto el análisis del riesgo relativo que cada una de las cepas de *Salmonella* estudiadas suponen en zumo de naranja como la validación del mismo (que son los principales objetivos de este trabajo) se llevaron a cabo partiendo de una misma concentración de células inicial para todas las cepas de *Salmonella*, los resultados obtenidos demostraron que las distintas cepas iban a inactivarse en diferente medida en cada uno de los tratamientos. Esto crearía un escenario en donde cada cepa sería tratada en un rango de concentración celular diferente. En este contexto, para poder realizar comparaciones válidas entre cepas era necesario determinar si la concentración celular afecta a la supervivencia frente a los diferentes agentes.

Así, se determinó la influencia de la concentración celular en la resistencia al tratamiento térmico, en la supervivencia en zumo post-tratamiento térmico y en el SGF, se seleccionó *S. Typhimurium* SL1344 como modelo. Para la invasión celular no se evaluó la influencia de la concentración, puesto que este proceso siempre se llevó a cabo con la misma ratio *Salmonella*-células (MOE) de 100:1.

4.3.1. Estudio de la influencia de la concentración celular en la resistencia a tratamiento térmico

Para evaluar la influencia de la concentración celular en la resistencia a tratamiento térmico, se realizó un ensayo donde se trataron térmicamente muestras de *S. Typhimurium* SL1344 a 10^5 UFC/ml y 10^7 UFC/ml a una temperatura de 56°C durante dos tiempos distintos, 25 y 75 segundos, para lograr inactivar alrededor de 1 ciclo y 2 ciclos, respectivamente. Los recuentos obtenidos se utilizaron para calcular el número de ciclos inactivados respecto del recuento inicial. Los resultados, recogidos en la figura 14, muestran cómo no se observan diferencias significativas en el número de ciclos inactivados independientemente de la concentración estudiada, eso sí, teniendo en cuenta el elevado valor de la desviación estándar. En los recuentos realizados en XLD se obtuvieron resultados similares. Por tanto, se puede establecer que la concentración celular no influye en la resistencia a tratamiento térmico. En este sentido merece la pena señalar que es un hecho bien conocido que la velocidad de inactivación térmica es independiente de la concentración celular (Gould, 1989), y que los resultados obtenidos respaldan esta hipótesis.

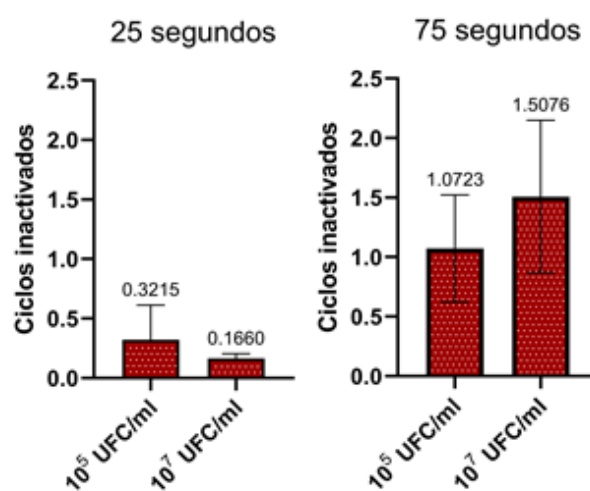


Figura 13: Ciclos de inactivación obtenidos para un tratamiento térmico a 56°C durante 25 y 75 segundos de *S. Typhimurium* a concentraciones iniciales de 10^5 UFC/ml y 10^7 UFC/ml.

4.3.2. Estudio de la influencia de la concentración celular en la supervivencia a la incubación en zumo a 4 °C tras el tratamiento térmico.

Con el objetivo de evaluar la influencia de la concentración celular en la supervivencia a la incubación en zumo a 4 °C tras el tratamiento térmico, se llevó a cabo un ensayo donde se trataron térmicamente dos muestras de zumo inoculado con *S. Typhimurium* SL1344 a concentraciones de 10^5 UFC/ml y 10^7 UFC/ml. Posteriormente, estas muestras se incubaron en zumo de naranja a 4 °C durante 144 horas (6 días). Los resultados, recogidos en la figura 15, mostraron como la inactivación siguió la misma tendencia tanto para la muestra que inicialmente tenía 10^5 UFC/ml como para la de 10^7 UFC/ml. En base a ello, se puede asumir que no existe una influencia de la concentración en la incubación en zumo de naranja a 4 °C tras tratamiento térmico.

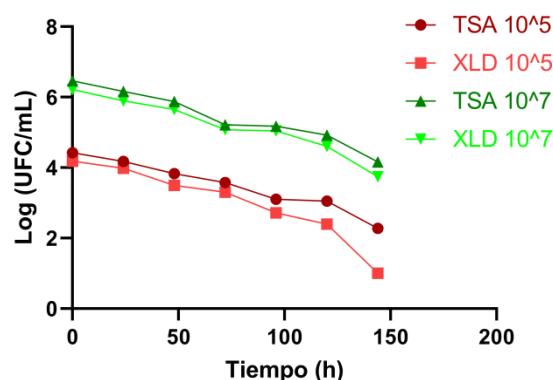


Figura 14: Influencia de la dosis, concentraciones inicial de 10^5 UFC/ml y 10^7 UFC/ml, en la supervivencia de células de *S. Typhimurium* SL1344 a 4 °C durante 144 horas tras un tratamiento térmico de 25 s a 56 °C.

4.3.3. Estudio de la influencia de la concentración celular en la supervivencia al tratamiento con SGF.

Finalmente, para evaluar la influencia de la concentración celular en la supervivencia al SGF, se llevó a cabo un ensayo inoculando el zumo a diferentes concentraciones iniciales, 10^5 y 10^7 UFC/ml. Los resultados obtenidos, recogidos en la figura 16, mostraron cómo ambas curvas de inactivación siguen la misma tendencia. Por lo tanto, de nuevo, no se observó la influencia de la dosis inicial en la supervivencia de *Salmonella* al SGF.

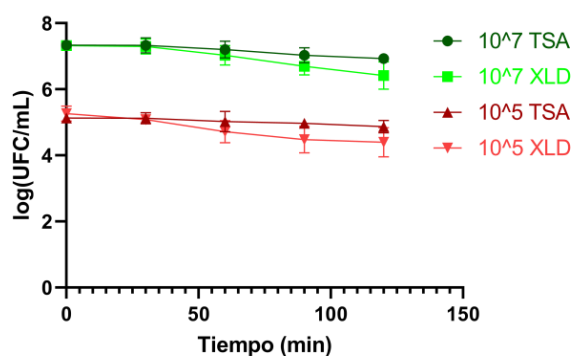


Figura 15: Gráficas de supervivencia al SGF de células de *S. Typhimurium* SL1344 inoculadas en zumo de naranja a concentraciones de 10^5 UFC/ml y 10^7 UFC/ml.

A la vista de los resultados obtenidos a lo largo de esta *Sección 4.3.*, se llegó a la conclusión de que la influencia de la dosis en la supervivencia a los distintos tratamientos era inexistente. Esto es extremadamente importante porque como se ha señalado antes, nos ha permitido hacer comparaciones válidas entre cepas en base a las ecuaciones y parámetros previamente definidos.

4.4. Análisis de riesgo *in silico*

Para llevar a cabo el análisis *in silico* del modelo en módulos diseñado, se utilizó el software de análisis probabilístico @Risk. Para ello se integraron en una hoja Excel todos los modelos (ecuaciones) calculadas en los apartados anteriores de este TFG. Mediante dicho modelo de análisis de riesgo se evaluaron tres escenarios distintos:

El primero de ellos en el que se determinó el riesgo (cuantificado con el número de células de *Salmonella* capaces de invadir el cultivo de células CaCo-2) asociado al consumo de zumo de naranja contaminado con las diferentes cepas de *Salmonella* y conservado a 4 °C. El segundo de ellos en el que se determinó el riesgo asociado al consumo de zumo de naranja contaminado con las diferentes cepas de *Salmonella* y conservado a 4 °C, pero habiendo sido previamente sometido a un tratamiento capaz de inactivar 5 ciclos logarítmicos de la cepa más termorresistente (criterio de proceso de los modelos determinísticos). En el tercero se determinó el riesgo asociado al consumo de zumo de naranja contaminado con las diferentes cepas de *Salmonella* y conservado a 4 °C y que había sido previamente

sometido a un tratamiento capaz de inactivar 5 ciclos logarítmicos de la cepa más termorresistente pero además teniendo en cuenta el efecto que este tratamiento térmico tenía en la supervivencia posterior en refrigeración. Las condiciones de iteración y las distribuciones probabilísticas de los parámetros para cada módulo del modelo fueron iguales para los tres escenarios.

Para el tratamiento térmico, se realizó la simulación considerando una inactivación que siguiera la cinética de Geeraerd con hombro. La temperatura seleccionada fue de 56 °C y el tiempo de tratamiento se seleccionó, como se ha indicado anteriormente, siguiendo el modelo determinístico habitual en la industria alimentaria, es decir, el tiempo necesario para inactivar 5 ciclos logarítmicos la cepa más termorresistente. De acuerdo con los resultados de la tabla 3, *S. Enteritidis* 4396 resultó ser la más termorresistente, siendo su tiempo de inactivación de 5 ciclos 266,24 segundos. En cuanto a los parámetros D y S_b , en ambos casos se seleccionó una distribución normal definida con los valores promedios y la desviación estándar para cada cepa.

En cuanto a la supervivencia en incubación en zumo a 4 °C, se consideró una inactivación definida por una cinética exponencial (lineal si se aplican logaritmos). El tiempo de tratamiento fue definido por medio de una distribución uniforme truncada entre 24 y 168 horas, siendo considerados esos valores el rango de tiempo de permanencia en un refrigerador. Para el parámetro D se estableció una distribución normal definida con los valores promedios y la desviación estándar para cada cepa.

En relación con el efecto de los fluidos gástricos, se consideró una inactivación definida por una cinética exponencial (lineal si se aplican logaritmos). El tiempo de residencia en el estómago fue definido por medio de una distribución beta general, en base al modelo de vaciado del estómago descrito por (Bürmen et al., 2014). Para el parámetro D se estableció una distribución normal definida con los valores promedios y la desviación estándar para cada cepa.

Por último, para la capacidad de invasión celular esta se determinó en base a los porcentajes de invasión previamente determinados. Se estableció una distribución normal definida por los valores promedios y la desviación estándar para cada cepa.

Los resultados de las simulaciones en @Risk, recogidos en la tabla 5, muestran cómo el riesgo relativo de *Salmonella* disminuye con la aplicación de los tratamientos térmicos y, todavía más, si se tiene en cuenta el efecto del tratamiento térmico en la supervivencia en refrigeración posterior. Estos resultados evidencian, al comparar los resultados del escenario control frente a los escenarios con tratamientos, que el riesgo asociado al consumo de zumo de naranja contaminado con células de *Salmonella* aumenta de forma considerable si estos no se aplican estos tratamientos. Además, la comparación de los escenarios con y sin efecto del tratamiento térmico en la supervivencia a 4 °C evidencia que el obviar las interacciones entre “módulos” u “operaciones básicas” puede conducir a sobre-estimaciones del riesgo o de la intensidad de los tratamientos a aplicar, lo que justifica todos los ensayos realizados en la Sección 4.2.

Así mismo, los resultados obtenidos indican que, por una parte, el mayor riesgo relativo (hay que recordar que se han asumido contaminaciones iniciales iguales, algo que no ocurre en la realidad pues la frecuencia de las diferentes cepas en estos productos es muy variable) corresponde a la misma cepa en los tres escenarios, siendo *S. Enteritidis* 7236 la cepa con el riesgo más elevado. Esto adquiere sentido al tener en cuenta que es la cepa más virulenta y la segunda con mayor resistencia al ácido y al calor, solo por detrás de *S. Kentucky* en el caso del medio ácido y de *S. Enteritidis* 4396 en el caso del calor. Por otra parte, estos resultados también revelan que, incluso en los escenarios en los que se ha aplicado un tratamiento térmico, la cepa más termorresistente (*S. Enteritidis* 4396) no es la cepa que supondría un mayor riesgo, ya que en ambos escenarios ha sido la cepa *S. Enteritidis* 7236 la cepa con el riesgo más elevado. Esta “clasificación del riesgo” variará en función de las condiciones estudiadas (intensidad del tratamiento térmico, por ejemplo) pero el hecho relevante en este caso es que, como demuestra la simulación, los enfoques determinísticos y centrados en una sola etapa de la cadena deberían ser progresivamente sustituidos por estos enfoques probabilísticos que proporcionen una mayor y más integrada información.

Tabla 5: Número final de células de cada una de las cepas de *Salmonella* estudiadas capaces de invadir los cultivos de células CaCo2 en los diferentes escenarios estudiados y partiendo de un número inicial= 10^7 UFC/ml. Simulación *in silico* realizada con @Risk. Los parámetros obtenidos son el valor promedio, el intervalo de confianza al 90% (IC: 90%) y la desviación estándar (SD). Los resultados se incluyen para los tres escenarios estudiados: control (sin tratamiento térmico), proceso que incluye un tratamiento térmico y proceso en el que, además del tratamiento térmico, se tiene en cuenta el efecto de este en la supervivencia de *Salmonella* en zumo a 4 °C.

Cepa y parámetros		Control	Con tratamiento térmico	TT + efecto en supervivencia a 4 °C
SL1344	Promedio	3.728,57	0,0128	0,00322
	IC: 90 %	± 15,65	± 0,000466	± 0,0002676
	SD	3.008,47	0,0897	0,0514
Kentucky	Promedio	8.556,11	0,000412	7,120E-005
	IC: 90 %	± 26,96	± 7,239E-006	± 2,443E-006
	SD	5.183,68	0,001392	0,000470
ST4396	Promedio	1.217,24	0,01461	0,00249
	IC: 90 %	± 4,95	± 8,958E-005	± 3,104E-005
	SD	952,21	0,01722	0,00597
SE4155	Promedio	2.064,04	0,0330	0,00645
	IC: 90 %	± 9,31	± 0,000436	± 0,0001856
	SD	1.789,01	0,0839	0,0357
SE7236	Promedio	20.294,20	0,543	0,181
	IC: 90 %	± 59,77	± 0,00611	± 0,00525
	SD	11.491,04	1,174	1,009

4.5. Validación *in silico* e *in vitro* de la cadena real

En la última parte de este trabajo se procedió a validar los resultados obtenidos *in silico* reproduciendo *in vitro* la cadena alimentaria y proceso gastrointestinal.

Este ensayo se llevó a cabo para las 5 cepas de *Salmonella* estudiadas, inoculación del zumo e incubación 24 horas a 4 °C, tratamiento térmico a 56 °C durante 80 segundos, incubación posterior del zumo durante 24 horas a 4 °C,

exposición al SGF y SIF durante 120 y 120 min y posteriormente ensayo de invasión de células CaCo-2. Por cuestiones metodológicas, el zumo se inoculó a una concentración de 10^{10} UFC/ml para garantizar tener el número suficiente de células vivas en el ensayo de invasión final. Los resultados, que se han recogido en la figura 17, muestran como hubo diferencias entre las 5 en cuanto a la inactivación a lo largo del modelo *in vitro*. Los recuentos promedio del número final de células obtenido, indicados en la tabla 6, mostraron que experimentalmente *S. Enteritidis* 7236 es la cepa con mayor riesgo, con $217.108,8 \pm 362.336,0$ células finales, mientras que *S. Enteritidis* 4396 es la cepa con menor riesgo, con $22.680,6 \pm 34.723,8$ células finales.

Para realizar la validación *in silico*, se llevó a cabo una simulación con @Risk siguiendo el mismo procedimiento explicado en la Sección 4.4. para el modelo que consideró la inactivación por

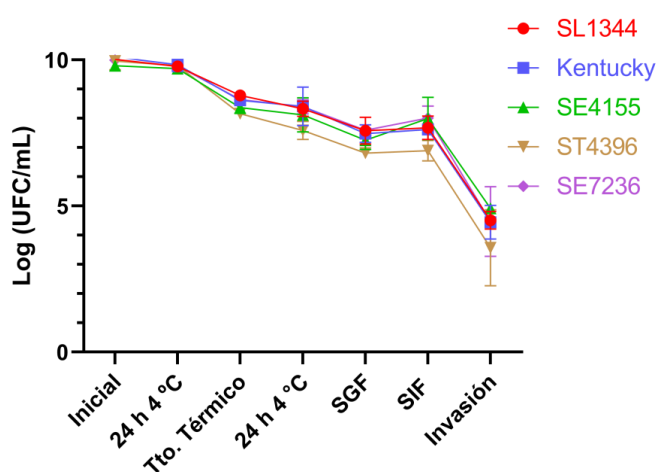


Figura 16: Gráficas de supervivencia para el ensayo de validación *in vitro* del modelo en módulos para las cepas *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis* 4155, *S. Enteritidis* 4396, *S. Enteritidis* 7236 y *S. Kentucky* 5799.

tratamiento térmico, la inactivación por incubación en zumo de naranja a 4 °C post-tratamiento, el efecto de los fluidos gástricos y la capacidad de invasión de cada cepa. Solamente se adaptaron algunos parámetros a los valores usados en la simulación *in-vitro* de la cadena real, concretamente el tiempo de tratamiento térmico a 80 segundos a 56 °C, el tiempo de incubación a 4 °C en zumo a 24 horas y el tiempo de contacto con los fluidos gástricos a 120 minutos. Los resultados, recogidos en la tabla 7, muestran como el número de bacterias invasivas finales respecto a las iniciales es mayor que en el ensayo de la Sección 4.4. Esto es debido, esencialmente, a que la intensidad del tratamiento térmico fue mucho menor en estos ensayos de validación. En paralelo también se realizó una estimación *in-silico* del resultado de la exposición de las 5 cepas de *Salmonella* a esta cadena alimentaria simulada siguiendo el método determinístico y usando como parámetros fijos los valores promedios obtenidos en los diferentes tratamientos para cada una de las cepas.

Al comparar los resultados *in vitro* con los obtenidos en el modelo *in silico*, se observan ciertas diferencias ya que los resultados de la validación probabilística *in silico* indicaban que el riesgo promedio (determinado indirectamente como el número de células de *Salmonella* que invadirían el tejido intestinal) podría ser mayor que el estimado en los resultados *in vitro* y, en general también, que el que se estimaría mediante los modelos determinísticos. En cualquier caso, las diferencias nunca llegaron a un ciclo logarítmico y fueron casi inexistentes en el caso de *S. Enteritidis* 4396 donde no se apreciaron apenas diferencias, tabla 7. Desde un punto de vista microbiológico estas diferencias no son relevantes, dada la variabilidad biológica y los errores experimentales que se podrían haber acumulado no sólo al hacer la validación *in vitro*, sino también al determinar las ecuaciones que gobiernan la inactivación y/o capacidad de invasión y que han sido incluidas en el modelo, especialmente en el caso de este último proceso.

Estas diferencias también podrían atribuirse inicialmente al hecho de que el modelo *in silico* utiliza una combinatoria probabilística de los parámetros que determinan el modelo, por lo que es posible que se produzcan iteraciones que generen un escenario final de elevado riesgo. Los resultados obtenidos mediante la estimación determinística de las cepas 4396, 4155 y 7236 indican que esto no sería así, pues son similares a los obtenidos mediante el modelo probabilístico.

Tabla 6: Resultados del número final de células invasivas en la validación *in silico* realizada con @Risk y en la validación *in-vitro*. Los parámetros obtenidos son el valor promedio, el intervalo de confianza al 90% (IC: 90%) y la desviación estándar (SD).

N_t final (N₀=10¹⁰ UFC/ml)		Estimación <i>in-silico</i> probabilística	Estimación <i>in-silico</i> determinística	Validación <i>in-vitro</i>
SL1344	Promedio	123.715,70	37.747,19	37.553,7
	SD	237.077,26	----	19.933,2
Kentucky	Promedio	108.662,90	31.196,48	42.315,2
	SD	209.106,36	----	32.360,0
ST4396	Promedio	17.726,89	17.794,79	22.680,6
	SD	9.626,77	----	34.723,8
SE4155	Promedio	191.380,46	194.019,24	55.600,8
	SD	175.413,97	----	48.344,8
SE7236	Promedio	712.716,01	672.678,83	217.108,8
	SD	507.277,77	----	362.336,0

Si bien en este caso concreto el modelo determinístico predeciría razonablemente bien el resultado obtenido *in vitro*, también lo es que no proporciona ninguna estimación de la variabilidad/probabilidad que tiene cada uno de los resultados, con lo que, por ejemplo, en este caso, se podría estar subestimado el riesgo asociado a cepas como SL1344 y Kentucky o 4396 a la vista de las elevadas desviaciones estándar que indican la existencia de una elevada probabilidad de la aparición de escenarios alejados del caso “promedio”. Por ello, los análisis de riesgo probabilísticos *in-silico* se postulan como la mejor herramienta más realizar este tipo de ensayos y de cara a la toma de decisiones. En cualquier caso, hay que señalar que en todos los casos la cepas 7236 y 4136 fueron las que supondrían un mayor

y menor riesgo en el escenario estudiado lo que significa que, para estimaciones de riesgo relativo, las tres herramientas (y al menos en este caso) podrían resultar útiles.

5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

A la vista de los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado, se extraen las siguientes conclusiones. En primer lugar, los ensayos de caracterización de la capacidad de resistencia e invasión realizados para las cepas de *Salmonella* empleadas permitieron determinar el comportamiento microbiano en cada uno de los módulos del modelo diseñado. La supervivencia en zumo de naranja varió entre las cepas dependiendo del tratamiento, siendo *S. Enteritidis* 4396 la cepa más resistente a tratamiento térmico y *S. Kentucky* la cepa más invasiva y la más resistente al fluido gastrointestinal. En cuanto a la interacción entre módulos se observó que el tratamiento térmico influía negativamente en la supervivencia posterior de las células de *Salmonella* en zumo de naranja a 4 °C, aspecto que se ha debido integrar en modelo de análisis de riesgo posterior. Así mismo, también se observó que la influencia de la dosis en la supervivencia a los distintos tratamientos era inexistente, lo que ha permitido hacer comparaciones válidas entre cepas partiendo de las ecuaciones y parámetros previamente definidos.

Una vez caracterizados los módulos y sus posibles interacciones, se llevó a cabo el análisis de riesgo comparado, tanto *in-silico* como *in-vitro*, de las 5 cepas. En ambos escenarios *S. Enteritidis* 7236 resultó ser la cepa con mayor riesgo relativo. El estudio *in-silico* es capaz de representar fielmente las condiciones fisiológicas, y los resultados obtenidos mostraron un riesgo similar al estudio *in-vitro*, lo que demostró su eficacia y utilidad como herramienta para el análisis de riesgo.

Los resultados obtenidos sugieren que los enfoques determinísticos deberían ser progresivamente combinados y/o sustituidos por enfoques probabilísticos que proporcionaran información más realista acerca del riesgo asociado a los diferentes productos y agentes patógenos. La metodología planteada y los resultados obtenidos en este trabajo pueden sentar las bases para futuras investigaciones que desarrollen modelos más complejos para analizar el riesgo microbiológico asociado al consumo de zumo de naranja, u otros alimentos.

Based on the results obtained from this Final Degree Project, the following conclusions can be deduced. First of all, characterization assays of the resistance and invasion capacity were studied on different *Salmonella* strains, allowed us to determine the microbial behavior in each of the modules of the designed model. Survival in orange juice varied among strains depending on the treatment, *S. Enteritidis* 4396 was the most heat resistant and *S. Kentucky* the most invasive strain the most resistant to gastrointestinal fluid. Regarding the interaction among modules, it was observed that heat treatment had a negative influence on the subsequent survival of *Salmonella* cells in orange juice at 4 °C, an aspect that should have been integrated into the risk analysis model. Furthermore, it was also determined that the influence of the dose on survival in the different treatments was inexistente, so that valid comparisons between strains could be made, according to equations and parameters previously defined.

Once the modules and its interactions were characterized, the comparative risk assessment of the 5 strains was carried out, both *in-silico* and *in-vitro*. In all scenarios studied, *S. Enteritidis* 7236 was the strain with the highest relative risk. The *in-silico* approach is able to represent faithfully physiological conditions, and the results obtained showed a similar risk to in *in-vitro* approach, which demonstrated its efficacy and usefulness as risk assessment tool.

All the results obtained suggest that deterministic approaches should be progressively combined and/or replaced by probabilistic approaches that provide more realistic information about the risk associated with different products and pathogens. The methodology proposed and the results obtained in this study might be a solid basis of knowledge for future investigations that develop more complex models to analyze the microbiological risk associated with the consumption of orange juice, or other foods products.

6. REFERENCIAS

- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & López, M. (2012). The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45(2), 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002>
- Bürmen, B., Locatelli, I., Bürmen, A., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2014). Mathematical modeling of individual gastric emptying of pellets in the fed state. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(4), 418–424. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50083-4](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50083-4)
- Chai, S. Y. (2013). *Detection and Enumeration of Salmonella Spp. And Salmonella Typhimurium in Fruit Juices*. Universiti Malaysia Sarawak.
- Comisión Europea. (2005). REGLAMENTO (CE) 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 338, 1–24.
- Condón, S., Arrizubieta, M. J., & Sala, F. J. (1993). Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC Improvement of this methodology. *Journal of Microbiological Methods*, 18(4), 357–366. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(93\)90017-C](https://doi.org/10.1016/0167-7012(93)90017-C)
- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 28, Issue 4, pp. 901–937). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- Danyluk, M., Goodrich-Schneider, R., Schneider, K., Harris, L., & Worobo, R. (2012). Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices, 1922–2019. *Edis*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.32473/edis-fs188-2020>
- Diana, Pui, C. F., & Son, R. (2012). Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in fruit juices. In *International Food Research Journal* (Vol. 19, Issue 1). [http://www.ifrj.upm.edu.my/19_\(01\)_2011/\(7\)IFRJ-2011-280.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/19_(01)_2011/(7)IFRJ-2011-280.pdf)
- ELIKA. (2021). *Salmonella*. <https://seguridadalimentaria.elika.eus/salmonella/>
- European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA y ECDC). (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- FAO. (2002). *Risk Assessments of Salmonella in Eggs and Broiler Chickens*. <http://www.fao.org/3/y4392e/y4392e00.htm>
- Farnworth, E. R., Lagacé, M., Couture, R., Yaylayan, V., & Stewart, B. (2001). Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International*, 34(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00124-1)
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185–209. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00362-7)
- Gould, G. W. (1989). Heat-induced injury and inactivation. In *Mechanisms of action of food preservation procedures* (pp. 11–42). Elsevier Science Publishers.
- Grimont, P. A. D., & Weill, F.-X. (2007). *Salmonella antigenic formulae of the Salmonella serovars* (9th ed.). WHO Collaborating Centre for Reference and Research.

- Grimont, P. A., Grimont, F., & Bouvet, P. (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. In *Salmonella in domestic animals* (pp. 1–17). <https://doi.org/https://doi.org/10.1079/9781845939021.0000>
- Guillén, S., Marcén, M., Álvarez, I., Mañas, P., & Cebrián, G. (2020). Stress resistance of emerging poultry-associated *Salmonella* serovars. *International Journal of Food Microbiology*, 335(September), 108884. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108884>
- Guillén, S., Nadal, L., Álvarez, I., Mañas, P., & Cebrián, G. (2021). Impact of the resistance responses to stress conditions encountered in food and food processing environments on the virulence and growth fitness of non-typhoidal salmonellae. *Foods*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/foods10030617>
- Hanning, I. B., Nutt, J. D., & Ricke, S. C. (2009). Salmonellosis outbreaks in the united states due to fresh produce: sources and potential intervention measures. In *Foodborne Pathogens and Disease* (Vol. 6, Issue 6). <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0232>
- Hill, A., Simons, R., Ramnial, V., Tennant, J., Cheney, T., Snary, E., Laboratories, V., Swart, A., Evers, E., Nauta, M., Swanenburg, M., Leusden, F. Van, Vigre, H., Domingues, A. R., Barfod, K., Pedersen, U. B., & Food-dtu, T. H. (2010). Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in Slaughter and Breeder pigs: Final Report. *EFSA Supporting Publications*. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2010.EN-46>
- Howe, K., Salehi, S., Hartford Bailey, R., Brooks, J. P., Wills, R., Lawrence, M. L., & Karsi, A. (2017). Supplemental invasion of *Salmonella* from the perspective of *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Typhimurium. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0989-3>
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. In *Veterinary World* (Vol. 12, Issue 4, pp. 504–521). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella* and *Shigella*. In *Modern Food Microbiology* (pp. 619–636). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4427-2_26
- Lake, R., Hudson, A., & Cressey, P. (2002). Risk profile: *Salmonella* (non-typhoid) in poultry (whole and pieces). *Institute of Environmental Science Research Limited Christchurch Science Centre*, 212, 1–63. www.esr.cri.nz
- Le Minor, L., & Popoff, M. Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., norn. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 465–468.
- Liu, D. (2017). *Salmonella*. In *Laboratory models for foodborne infections* (pp. 391–399). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781315120089>
- Marín, S., Ramos, A. J., Falguera, V., & Ibarz, A. (2014). Safety in fruit juice processing: Chemical and microbiological hazards. In *Juice processing: quality, safety and value-added opportunities* (pp. 329–348). <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b16740>
- Mazzotta, A. S. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 64(3), 315–320. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.315>
- McQuiston, J. R., Fields, P. I., Tauxe, R. V., & Logsdon, J. M. (2008). Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends in Microbiology*, 16(4), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.009>

- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- NCBI. (2021). *Taxonomy browser (Salmonella)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=salmonella>
- Nutt, J. D., Li, X., Woodward, C. L., Zabala-Díaz, I. B., & Ricke, S. C. (2003). Growth kinetics response of a *Salmonella typhimurium* poultry marker strain to fresh produce extracts. *Bioresource Technology*, 89(3), 313–316. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00084-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00084-1)
- OMS. (2007). Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. In *Estudio FAO Alimentación y nutrición* (Vol. 87). <http://www.fao.org/3/a0822s/a0822s.pdf>
- Oscar, T. P. (2004). A quantitative risk assessment model for *Salmonella* and whole chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 231–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.002>
- Rabsch, W., Simon, S., & Humphrey, T. (2013). Public Health Aspects of *Salmonella* Infections. In *Salmonella in domestic animals* (pp. 351–376). <https://doi.org/https://doi.org/10.1079/9781845939021.0000>
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 157–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00076.x>
- Rycroft, A. N., Barrow, P., & Methner, U. (2013). Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Salmonella*. In *Salmonella in domestic animals* (2nd ed., pp. 20–37). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1079/9781845939021.0000>
- Sanderson, K. E., Nair, S., Barrow, P., & Methner, U. (2013). Taxonomy and species concepts in the genus *Salmonella*. In *Salmonella in domestic animals* (2nd ed., pp. 1–19). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1079/9781845939021.0000>
- Sherry, A. E., Patterson, M. F., & Madden, R. H. (2004). Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 887–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02211.x>
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J., & Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. In *Epidemiology and Infection* (Vol. 125, Issue 2, pp. 229–255). <https://doi.org/10.1017/S0950268899004379>
- Yang, Y., Khoo, W. J., Zheng, Q., Chung, H. J., & Yuk, H. G. (2014). Growth temperature alters *Salmonella Enteritidis* heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.006>
- Yuk, H. G., & Schneider, K. R. (2006). Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology*, 23(7), 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.003>